

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

SULFATED POLYSACCHARIDE DS 4152 AND VASCULARIZATION INHIBITOR AND ANTITUMOR AGENT CONTAINING THE SAME

Patent Number: JP63119500

Publication date: 1988-05-24

Inventor(s): INOUE KAZUKIYO; others: 03

Applicant(s): DAI ICHI SEIYAKU CO LTD

Requested Patent: JP63119500

Application Number: JP19870125443 19870522

Priority Number(s):

IPC Classification: C07K15/14; A61K31/725; A61K37/02; C08B37/00; C12P19/04

EC Classification:

Equivalents: JP2544136B2

Abstract

NEW MATERIAL: A sulfated polysaccharide DS 4152 having the following physical and chemical properties. Molecular weight, 29,000+ or -3,000; elemental analysis (%), C 24.42-25.76, H 3.34-3.98; N 0.51-0.89, S 10.6-11.7, P 0.77-1.06; sugar content, 57+ or -3; protein content, 1+ or -0.5; specific rotation, $[\alpha]D<25>=-37+$ or -1 deg. (0.5% aqueous solution); main IR absorption band, 1,240, 840 (shoulder), 810 (cm⁻¹; KBr); solubility, easily soluble in water and almost insoluble in organic solvents such as ether, benzene, chloroform, methanol, ethanol, etc.; pH, 6-8 (3% aqueous solution); etc.

USE: A vascularization inhibitor and antitumor agent. The activity can be promoted when combined with a steroid drug.

PREPARATION: For example, pyrogenic substance, etc., having a molecular weight of $>=15\times10^4$ are removed by a proper molecular weight fractionation method from DF 4639 separated from a cultured product of *Arthrobacter* sp. AT (FERM P-5255).

Data supplied from the esp@cenet database - I2

1980

⑨ 日本国特許庁 (JP) ⑩ 特許出願公開
 ⑪ 公開特許公報 (A) 昭63-119500

⑤ Int.CI.
 C 07 K 13/14
 A 61 K 31/725

登別記号 厅内登録番号
 ABL 8318-4H
 ABY 7252-4C※審査請求 未請求 発明の数 5 (全13頁)

⑥ 発明の名称 低吸水多糖体 DS 4152並びにこれを含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤
 ⑦ 特許登録番号 昭62-125443
 ⑧ 出願日 昭62(1987)5月22日
 ⑨ 登録主張 ⑩ 昭61(1986)5月23日 ⑪ 日本 (JP) ⑫ 特願 昭61-118847
 ⑬ 発明者 井上 和 治 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内
 ⑭ 発明者 田中 紀 子 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内
 ⑮ 発明者 是 永 博 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内
 ⑯ 出願人 第一製薬株式会社 東京都中央区日本橋3丁目14番10号
 ⑰ 代理人 弁理士 有賀 三季 外2名
 最終頁に続く

明 確 書

ガラクトース酸量)

1. 発明の名称
 低吸水多糖体 DS 4152 並びにこれを含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤
 蛋白含量(%) : 1 ± 0.5 (ローリー・フォーリン法、牛血清アルブミン標準)

2. 特許請求の範囲
 (1) ナトリウム塩として下記の物理化学的性質を有する低吸水多糖体 DS 4152。
 (2) 分子量(ゲルろ過法による)
 22000±3000
 (3) 元素分析値
 C 24.42~25.70% H 3.34~3.66%
 N 0.51~0.59% S 1.00~1.17%
 P 0.77~1.06%
 (4) 酸性度
 (a) $\text{pH} = 3.7^{\circ} \pm 1^{\circ}$ (0.5%水溶液)
 (b) 赤外線吸収スペクトルに示す主要吸収帯
 1240, 840(弱), 610(=; KBr)
 (c) 溶解性
 水に易溶。エーテル、ベンゼン、クロロブレン、メタノール、エタノール等の有機溶媒には殆ど不溶。
 (5) 色反応
 フェノール-硫酸、アンスロシン-硫酸、ビニレット反応およびローリー・フォーリン反応

蛋白含量(%) : 5.7 ± 0.3 (フェノール-硫酸法、

特開昭63-119500(2)

2. 保菌化多糖体 DS-4152 を有効成分として含有する血管新生抑制剤。
3. リューマチ性関節炎、増殖性関節炎、乾燥、糖尿病性網膜炎、末梢性神經症に有効な特許請求の範囲第2項記載の血管新生抑制剤。
4. 保菌化多糖体 DS-4152 を有効成分として含有する抗腫瘍剤。
5. 保菌化多糖体 DS-4152 と、ステロイド剤とを有効成分として含有する血管新生抑制剤。
6. ステロイドが糖質コルチコイド類、液体ホルモン類、エストラン類及びアンドロスタン類から選ばれたものである特許請求の範囲第6項記載の血管新生抑制剤。
7. リューマチ性関節炎、増殖性関節炎、乾燥、糖尿病性網膜炎、末梢性神經症に有効な特許

は陽性。水溶液のエルソン・マルガン反応とびュンヒドリン反応も陽性。カルバゾール反応とび波ロ反応は陰性。

(10) 酸性、中性、鹼性の区别

pH 0~8 (3% 濃度水溶液)

(9) 構成糖かとび炭酸基、糖の含量

D-グルコース、D-ガラクトース、30.0%
シエジア(糖)の含有モル比はD-グルコースを1.0としてそれぞれ1.0:6.1:7.3
:0である。

(11) 氨酸アミノ酸かとびアミノ酸

疎水性化合物のアミノ酸分析計による分析で、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シアミノピメント酸、グルコアミンかとびムクミン酸の存在を認める。

水の範囲第6項記載の血管新生抑制剤。

2. 保菌化多糖体 DS-4152 と、ステロイド剤とを有効成分として含有する抗腫瘍剤。

3. 見明の特徴を説明

(臨床上の利用分野)

本発明は、肝臓を保菌化多糖体 DS-4152 並びにこれを有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤並びにこれと更にステロイド剤を含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤に属する。

(従来の技術及びその問題点)

従来、イタコフカス DS-415-380 等の免疫生物学中に腫瘍抑制作用、感染抑制作用およびインターフェロン誘導作用を有する保菌化多糖体 DS-4150 が存在することが知られて

いた(特開昭56-67301号、特開昭57-42627号および特開昭59-35320号)。

本発明者らは、既々の有用性の期待される保菌化多糖体 DS-4150 について生物学的特性を明らかにすべく検討をかけた結果、DS-4150 が強い見通性を有することを知った。

(問題を解決するための手段)

そこで、本発明者らは、この発明性を実現をさせすべく、更に研究をかけたところ、DS-4150 は、いくつかの成分の混合物であり、そのうちの DS-4152 と名づけられた一成分は弱毒性がなく、しかも優れた血管新生抑制作用及び抗腫瘍作用を有することを見出した。

特開昭63-119500 (3)

更にまた、本発明者は、このDS 4152とステロイド剤とを組合せると血管新生抑制作用及び抗腫瘍作用が相乗的に増強されることを見出した。

本発明は、上記の如きに若くものであり、その目的は、既成な炭酸化多糖体DS 4152を提供するものである。

また、本発明の他の目的は、炭酸化多糖体DS 4152を有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤を提供するものである。

更に、本発明の他の目的は、炭酸化多糖体DS 4152とステロイド剤とを有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤を提供するものである。

本明細書中の「血管新生抑制剤」とは、既の

発育、実体形成、腫瘍の治療等に用ひて茎葉などだけでなく、調和リューマチを含む慢性炎症、免疫亢進、結核等の病的状態にシテてもその身体の過盛に及く調和している血管の新生作用を弱めることをいう。したがつて、血管新生抑制剤は、上記血管の新生作用が関与する慢性炎症、例えばリューマチ性関節炎、増殖性關節炎、足疾、糖尿病性腎炎、末梢児病等の治療、予防に有用をものである。特に腫瘍は強い血管新生を促し、新生された血管より供給される血液がさらに腫瘍の増殖と進展を促進するとされているので、抗腫瘍剤としても有効である。

本発明の炭酸化多糖体DS 4152は、アルエロバクター sp. AT-25 (工業技術院生

物工業技術研究所には、Micrococcus sp. AT-25として、PERK P-5255及びArthrobacter sp. AT-26としてPERK SP-1337の番号で登録されている)の培養液から分離されるDP 4639 (特開昭60-67301号参照)から、その中に含まれる分子量約 1.5×10^6 以上の免疫活性等を過当な分子量分画法、例えばゲルろ過法や膜ろ過法、アルコール沈殿法で除くことによつて得られる。

すなわち、ゲルろ過法によればDP 4639を過当なゲルろ過粗体、例えば、セファタリル (Sephadex G-300 (ファルマシア製))を用いてゲルろ過を行い、得られるフラクションについて高速ゲルろ過クロマトグラフィ

ー (実験ソーダ液0.3000 SWカラム使用)を行い、検出波長 (マイド・ペリューム、void volume) にピークを示すフラクション (R面分) とマイド・ペリュームにピークを示す分子量約 2×10^6 ~ 8×10^6 の範囲に溶出されるフラクション (L面分) を各々集め、透析する。

また、吸収干渉は過当を除く例えばAnelco社製のTM10、TM30、XK50、PM30やFilter社製のNOVAL100、OMEGAL100、NOVAGO、OMEGA50 等特にTM10)を用い、窒素ガスによる加圧またはベリスタリック (peristaltic) ペンプによつて加圧 (0.5~5.0 atm) し、透析液をDS 4152として用ひればよい。使用溶媒は、水-エタ

ノール(10:2~3)または水が適当でも
り、4℃乃至室温で行なうのが一般的である。

得られた各透析内液を最終後ろ通し、ろ液
を数倍量のエタノール中に浸漬下圧下ことに
より生成する白色沈澱を蒸し、90%エタノ
ール、エタノール、アセトシンの順に洗った後、
減圧乾燥すれば、目的とする DS 4152 (レ
酸分)と異常性物質(2酸分)が各々得られ
る。

こうして得られる DS 4152 は以下に述べ
る物理化学的特性を示す。下記の性質はセ
リウム塩についてのものである。

(III) 分子量(ゲルろ過法による)

29000±3000

(IV) 元素分析値(2.0gの値を示す)

カル、メタノール、エタノール等の有機溶媒
には溶と不溶。

(V) 風色反応

フェノール-硫酸、アンスローン-硫酸、ビ
ニレント反応¹およびニーリー-フォリント反応
は陰性。水溶液のエルソン-モルガン反応²
およびエンヒドリン反応も陰性。カルバゾール
反応および坂口反応は陽性。

(VI) 酸基性、中性、酸性の区別

DS 6~8 (3%濃度水溶液)

(VII) 氨成形および浸透压、水の含量

D-グルコース、D-ガラタース、30%
水³およびP(水)の含有モル比はD-グルコースを10としてそれぞれ約10:61:73
である。

特開昭63-119500 (4)

C 24.42~25.76% H 33.4~39.8%

N 0.51~0.89% S 1.06~1.17%

P 0.77~1.06%

(VIII) 水および蛋白質の含量

蛋白質(%): 6.7±3 (フェノール-硫酸
法、ガラタース法)

蛋白質(%): 1±0.5 (ローリー-フォ
リント法、牛血清アルブミン
標準)

(IX) 比旋光度

(a)_D²⁵ -3.7°±1° (0.5%水溶液)

(X) 紫外吸收スペクトルにおける主要吸収帯
1240, 840 (弱), 810 (m⁻¹; KBr)

(XI) 鹽解性

水に易溶。エーテル、ベンゼン、クロロホ

(XII) 氨成アミノ酸およびアミノ酸

酸加水分解物のアミノ酸分析計による分析
で、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シ
アミノピロリジン酸、グルコサミン⁴およびム
クミン酸の存在を認める。

以上 DS 4152 は、後記実験で示す如
く、单独でも血管新生抑制作用を有するもの
であるが、ステロイドと組合せることによ
り、更に優れた血管新生抑制作用を示す。

尚、本発明の血管新生抑制剤においては、
DS 4152 の代りにヘパリン、低分子ヘパリ
ン等を使用することもできる。

使用、アレドニゾン、ローマナルアレ
ドニゾン、デキサメタゾン等のステロイド
ホルモンが、炎症性疾患、児童病、ヘルヌ

一頭型に実験的に説明された血管新生を抑制する作用を有することが報告されている

(*Cancer Res.* 39 1308 (1979) J. N. H. S., *Cancer Res.* 39 760 (1979) 及び *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 1176 (1981))。

また、ステロイドホルモンのうち、雄性ホルモン（アレドニゾン、アレドニゾン、ベタメゾン等）は白血病、悪性リンパ腫、乳癌、精立腺癌の治療に使用されている。

更に、アンドロスタンを母核とする男性ホルモンであるテストステロンアロピオキート、フルオキシメスチロン等が抗乳癌薬剤として用いられており、20~30%の有効率が得られると報告されている (*Oncology* 10 72 (1964))。

ジョンクルコルチコイドの母核とされるアセテート、ヘキサクシネット、オクスフェート、アカルアセテート、ナトロヒドロフタレート、トリメチルアセテート等）；メチルアレドニゾンクルコルチコイドの母核とされるアセテート、ヘキサクシネット等）；ベタメゾンクルコルチコイドの母核（オクスフェート、ペレレート等）が挙げられる。

また、グルココルチコイドのC-11位の水酸基がC-11位になった異性体（たとえば、11α-エピヘイドロコルチゾン）も含まれるし、前記グルココルチコイドのナトロヘイドロ代謝物（グルココルチコイドは他の有効は説明しない）も含まれる。

更に、雄性ホルモンであるアロゲステロン、

特開昭63-119500 (5)

更にまた、アロゲステロンの母核体、テストステロンの母核体及びエストロジニン類が精立腺癌の治療に用いられている。

前記のD8-4152と組合せ用いることできるステロイド剤は、雄性ホルモン類、雄性ホルモン類、エストラジン類及びアンドロスタン類等であり、より具体的には次のものが開示される。

(1) アレドニゾンを母核とするステロイドホルモン、ナホカラゲルコルチコイドであり、たとえばコーテゾンクルコルチコイドの母核（アセテート、エナンテート、クンデシレート等）；ヘイドロコーテゾンクルコルチコイドの母核（アセテート、ヘキサクシネット、カブロエート等）；アレドニゾンクルコルチコイドの母核；アレドニ

メドロキシアロゲステロンクルコルチコイドの母核（アセテート等）；ダイドロゲストロンクルコルチコイドの母核（アセテート等）等があげられる。

更にまた、ミネラルコルチコイドであるアンドロステロン、ダソヤシコルチコスチロンクルコルチコイドの母核（アセテート、トリメチルアセテート、エナンテート、フェニルアロピオキート等）もあげられる。

(2) アンドロスタンを母核とするステロイドホルモン、ナホカラ、雄性ホルモンであり、たとえば、アンドロステロン、テストステロンクルコルチコイドの母核（アロピオキート、エナンテート、ブタレート、カブリレート等）があげられる。また、エピテオスターールクルコルチコイドの母核（アロピオキート、エナンテート、ブタレート、カブリレート等）があげられる。

その固導体、ミピテオステンがあげられる。さらにフルオロカシタステロンシル及びその固導体、メテルテストロンシル及びその固導体、ステノロンシル及びその固導体も含まれる。

(3) エストランを母核とするステロイドホルモン、すなわち、卵胞ホルモンであり、たとえば、エストロンシル及びその固導体、エストラジオールシル及びその固導体(ベンゾエート、シクロピオネット、パレレート、ウンデセノエート等)、エストリオールシル及びその固導体(トリプロピオネット等)があげられる。

不育男の血管新生抑制剤の用量としては、有効成分を医学的に許容される量、即ち含有する量の形態、例えば水または各種の電解質に溶解させた液剤、散剤、顆粒

である。経口による投与の場合は通常1日1/5量が適量である。

また、不育男の血管新生抑制剤を抗凝血剤として用いる場合の投与方法及び用量も、ほぼ上記と同じである。

(発明の効果)

本発明のDS-4152はそれ单独であつても血管新生抑制作用を有するが、これを更にステロイド剤と組合せるとより強れた血管新生抑制作用を有する。

したがつて、DS-4152单独であつても血管新生抑制剤として有用であるが、更にステロイド剤と組合せたものは相乗的に作用が増強されるので、例えば腫瘍血管の新生を抑制し、癌の増殖を防ぐ血管新生抑制剤として用

特開昭63-119500(6)

用、服用、注射用、塗用等があげられる。

本発明の血管新生抑制剤がDS-4152とステロイド剤とを含有するものである場合、これらをそれぞれ別個に上記用法の单独に調合して組合せ用とすることも、あるいは両成分を含む合用とし製剤化することもできる。

本発明の血管新生抑制剤は、静脈内、皮内、皮下、皮膚内、粘膜内または直腸内に投与することができる。その投与量は、成人の経口一日量で、DS-4152として1~2000mg程度であり、ステロイド剤は男性ホルモン用、婦女ホルモン用で10~1000mg、通常30~60mgが適量で、漸減していくのが好ましいことがある。プロゲステロン用では100~1200mgが適量

である。経口による投与の場合は通常1日1/5量が適量である。

(実施例)

次に実施例を挙げ、本発明を更に詳しく説明する。

実施例1(1)

特開昭56-67301号に記載の方法により得られたDS-4839(50g)を15mlの0.1M NaClに溶解し、これを0.1M NaClで希釈したカラム(セファタリム-300; 50×80cm)にかけて両端面にて層出し、18mlずつ層出液を絞めた。得られたフラクションについて高速ゲルエリートグラフイー(ダブルソーラー製 93000 SWカラム、最高0.1Mの酸カラム吸収波長415nm)を行い、マイクロペリキュームにピータを与えず、

特開昭63-119500(7)

DS 4152 の物理化学的性質および生物学的性質を DP 4639 ととびその R 因子と比較して示す。

(4) 硫、蛋白、ミクとび R 因子(第 1 表)

第 1 表

	1) 硫(%)	2) ミク(%)	3) 蛋白(%)	4) R(%)
DS 4152	56	1.11	2.1	0.66
DP 4639	54	1.08	1.3	0.66
R 因子	42	7.9	7.6	0.72

1) エタノール-硫酸法(ガラクトース換算)

2) アントノボラスの方法(C.A.Antunes-Pereira, *Acta Chem.Scand.* 16, 1521 (1962))による

3) ローリー・フォーリン法(牛血清アルブミン換算)

4) チエンらの方法(P.S.Chien et al., *Anal.Chem.* 28, 1756 (1956))による。

(5) ガラクトース、グルコース、硫酸基とミクの構成モル比

液体を 1 規定強度中 100℃ で 5 時間加水分解しイオン交換樹脂で脱塩処理した後、常法によりアルギトールアセテートとしてガスクロマトグラフィーで分析した。また、硫酸基とミクのモル比は、ミクとびの含量(%)から算出した。

第 2 表

	ガラクトース	グルコース	硫酸基	ミク
DS 4152	6.1	1.0	2.3	0.6
DP 4639	6.2	1.0	2.3	0.6
R 因子	6.2	1.0	6.9	0.6

第 2 表は、グルコースを 1.0 モルとした場合

各の各成分のモル比の 1 例である。

(6) 構成アミノ酸とミクの定量

DS 4152 を 3 規定強度中、100℃ 1.6 時間加水分解した後、常法によりアミノ酸分析計にて分析した結果、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シアミノピロリン酸、グルコナミンとミクのモル比のピーカーを認めた。

(7) 比旋光度: $(\alpha)_D^{20}$ ($c=0.5$, 水)

第 3 表

	比旋光度
DS 4152	-37
DP 4639	-36
R 因子	-34

(8) グルコ糖基出バターン

第 1 図、第 2 図および第 3 図に、それぞれ

DS 4152, DF 4639 および其の部分の高純度
ゲル干過クロマトグラムを示す(東洋ソーダ
純度 99.999% ナトリウム使用, 温度 0.1K
移動カリクム濃度 0.005, 0.004/分,
標準物質テキストランテ-102 および T-40)。

(4) 紫外吸收スペクトル

280/260水溶液において 220~340 nm
に極大吸収は認められない。

(5) 紫外吸收スペクトル(EDTA)

1240, 840(弱) → および 810 nm (K), 8
置化多糖に特徴的な吸収を示す。

DS 4152 の構造としては、主としてローダラクトースとローダルコースから成る構成
部分にムラミン酸フォスマスファートを介してペ
プチドグリカン部の結合した複数化多糖体で

特開昭63-119500 (8)

ると推定される。

(6) 発熱性試験

日本薬局方(第10改正)に準じて行つた
発熱性試験の結果を以下表に示す。

以下値

試験 法	R ₁	R ₂					
		1	1	+	+	+	+
体液上昇法	R ₁	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
細胞	R ₁	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
用液 ml/10ml	7.6	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
7.6	3.75	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
DS 4152	DS 4639	II	II	II	II	II	II

(1) DS 4152 の生理性(マウス, 骨圧)は,
LD₅₀が 2000 mg/kg 以上である。

実験例 1 (3)

DF 4639 (0.02) を 300 ml のエタノール (10:3) 溶液に溶解し、TM10
膜 (41.8 cm², アイコン社製) を用いて、室
温で加圧 (1.5 kg/cm²) 下、直圧で膜外戻
通した。上記溶液を追加しながら透過液量が
約 3 ml となるまで実施した。透過程の最終液
(約 50 ml) に 100 mg の酵母ナトリウムを
加えて溶解した後、透心分離により得られる
上清を約 50 ml のエタノール中へ投拌下層
下した。生成した沈殿を集め、90% エタノ
ール、エタノール、アセトンの順に洗つた後、
減圧乾燥 (55°C, 3 時間) して DS 4152

○白色粉末を得た。

このものの物理化学的性質は、次に示す通り、S及びPの含量を除き、実験例1回のDS 4152と同一であった。

硫含量 88%

S含量 11.3%

蛋白含量 0.0%

P含量 0.92%

高圧ゲル渗透クロマトグラムを図4に示す(0.3000 SWカラム、0.1M硫酸ナトリウム緩衝液(pH 8.5)、0.8ml/分)。

実験例2

高圧液体血管新生阻止試験(直接法)：

周底を用い、ナイラーとフォーマン

(Nature 207: 307, (1962))の方法を一

べた。ステロイドとしては、コルチゾンを0.5mg/周底の量(血管新生に影響のない量)用いた。また、比較として、DP 4039及びE固分についてもその活性を調べた。この結果を第5表に示す。

第5表

50%血管新生阻止量(1D₅₀量)

	DS 4152	DP 4039	E固分
1D ₅₀ 量 (mg/周底)	3	30	600

実験例4

実験例2と同様の方法で、各種ステロイドとDS 4152の併用による1D₅₀量の変化を検討した。この結果、図4のステロイドに1.0

特開昭63-119500 (9)

而改良した以下の方法で行った。

馬(ノーリングクロス)の4~5日飼育用の食辰液に、生理食塩水で希釈したDS 4152又はヘパリンを添加し、37°Cで培養した。

高圧ゲル渗透クロマトグラムを図4に示す(0.3000 SWカラム、0.1M硫酸ナトリウム緩衝液(pH 8.5)、0.8ml/分)。

この結果、本実験のDS 4152の1D₅₀量は、100mgであった。これに対し、ヘパリンは、100mgでも作用を示さなかつた。

実験例3

高圧液体血管新生阻止試験(直接法)：

実験例2と同様にして、ステロイドと

DS 4152を併用した場合の効果について調

べた。ステロイドとしては、コルチゾンを0.5mg/周底の量(血管新生に影響のない量)用いた。また、比較として、DP 4039及びE固分についてもその活性を調べた。この結果を第6表に示す。

第6表

ステロイド	1D ₅₀ 量(mg/周底)	
	単独	DS 4152(増加倍数)
コルチゾンアセート	120	0.17 (7.1倍)
ハイドロコルチゾン	110	0.18 (6.6倍)
プレドニゾロン	130	0.08 (16.3倍)
6a-メチルプレドニゾロン	115	0.03 (38.3倍)
ベタメゾン	0.80	0.05 (16.0倍)
アトロハイドロ	100	0.01 (1000倍)
プログステロン	102	0.49 (21倍)
メトロキシプログステロンアセート	112	0.42 (27倍)
17β-エストラジオール	190	0.28 (7.0倍)
フルオキシチスチロン	124	0.12 (10.3倍)
5α-アンジオスタン	232	0.20 (8倍)

実験例5

血管新生阻止作用(0.01%法):

DS 4152 を生理食塩水に溶解し、ICR不規マウスに皮下もしくは口腔で投与し、6時間後に血液を採取した。0.313%タエン酸ナトリウムで凝固を阻止し、直腸法と同様に5日飼養後糞便重量に増加し、2日後に測定した。この結果を表7表に示す。

表7表

投与ルート	投与量 (mg/kg)	血管新生阻止率 (%)
口腔	3	15.9
	30	26.4
	300	62.7
皮下	3	1.6
	30	32.8
	300	66.1

表8表

投与ルート	DS 4152	DP 4639	差百分
皮下	92.2%	83.3%	8.9%
口腔	92.7%	86.8%	5.9%

DS 4152 及び DP 4639 は口腔、皮下いずれの経路によつても糞便血管新生を抑制することが認められた。

実験例6

血管新生阻止作用(0.01%法):

ICR不規マウスに、生理食塩水に溶解したDS 4152 を経口投与した。ステロイドは、DS 4152 と共にまたは単独で、生理食塩水に溶解して経口または筋肉内投与した。

投与6時間後に採血し、0.313%タエン

新規物63-119500 (10)

この結果から明らかのように、用量依存的な血管新生抑制作用が認められた。

実験例7

血管新生阻止作用(0.01%法):

実験例5と同様にして、ステロイドと DS 4152 を併用した場合の効果について調べた。ステロイドとしては、赤松コーナンを50mg/kgの割合で用い、DS 4152 は300mg/kg又は300mg/kgとなるよう調整して加えた。また、比較と CDP 4639 及び E 脱分を用いた。この結果を表8表に示す。また、表中の数値は、生理食塩水を同量投与した対照マウスより採取した血液を添加した糞便血管の発達度を100%とした時の阻止率である。

タエンナトリウムで凝固を阻止し、これを直腸法と同様に5日飼養糞便重量に加え、2日後に糞便血管に及ぼす効果を算定した。結果は、同量の生理食塩水のみを投与したマウスの、6時間経過後の糞便を加えた場合の糞便血管の発達度を对照とし、阻止百分率で示した。この結果は表9表の通りである。

以下余白

共同昭63-119500 (11)

実験例8

沈黙部試験：

DS 4152 / 日進マクス K 型水槽の沈黙部由実段水槽部 M 3070 を 1×10^6 倍度下減圧し、3 日目より DS 4152 を 30 倍 / 日 1 回度の回度下投与したところ、著名な沈黙部効果と生存日数の有意な延長が認められた。それをわち第 10 表に示すように第 21 日の重量平均重量は対照群の 37% (0.3% 約 1%) であり、かつメテイアン生存日数が対照群より 33% 延長した。

1 重量平均重量は、雌雄共の長鰓と短鰓の長さを測定し、以下の式から求めた。

$$\text{重量平均重量} = (\text{長鰓}) \times (\text{短鰓}) \times \frac{1}{2}$$

試験番号	物質名 (ルート)	投与量 (mg/kg)	DS 4152 投与量		雌雄平均重量 (kg)	
			(kg/kg)	(kg/kg)	(kg/kg)	(kg/kg)
	ローランジンセテート (0.01)	0	0	50	7.61	2.7
	アラバハイドロ B (0.01)	0	0	30	7.17	-2.6
	エタニスチノール (1.0)	0	0	50	-1.73	4.0
		0	0	30	6.2	1.84
		0	0	30	0	3.24
		0	0	30	0	2.42
		0	0	30	0	3.76

試験番号	物質名	雌雄平均重量 (kg/kg)		雌雄平均重量 (kg/kg)
		対照群	DS 4152 投与群	
M 3070	DS 4152	0	30	0.37

(a) DS 4152 / 日進マクス K 型水槽部由実段水槽部 M 3070 のメテイアン生存日数 / 対照群のメテイアン生存日数 (DS 4152) × 100
 (b) (M 3070 のメテイアン生存日数 / 対照群のメテイアン生存日数) - 100

実験例9

沈黙部試験：

DS 4152 / 日進マクス (3 週給) K ルコット 180 (0.180) を 1×10^6 倍度下減圧し、3 日目より赤城コートソンの生存水槽水槽水を 250 倍 / 日 / 80 群合で 3 日間、100 倍 / 日 / 日の群合で 1 日投与した。

DS 4152 は生存水槽水に溶解し、0.61 ましくは 0.1 倍 / マクスとなる様 1 日 1 回度下もしくは瓶口にて 4 日間投与した。多様な日目に用及して重量重量を対照と比較したところ第 11 表に示す如く赤城コートソンのみを投与した群では重量重量は生存水槽水群と差がなかったが、さらに DS 4152 を投与することにより重量を増加阻止作用が明らか

九、実用例の結果実量の90~125%であった。

実用例3-110500 (12)

実用例10

実験用:

DS 4152 60g、乳酸300g、トクモ
コシデンアン144g、カルボキシタルセ
ルロースカルシクム30g及びヒドロキシア
セピルセルロース30gを用い、方法に従つ
て500gの実験用を調製した。この実験用
は液状にわざわざ1850.0g~5Lを用意す
る。

実用例11

実験用:

DS 4152 12g、塩化ナトリウム90
gを実験用高密度水に溶解し、10gとする。
この溶液をメンブランフィルターで戻過した
後、アンプルに充填し、115℃で30分間

表11表

名 称	最終実量	
	平均密度 g/cm ³	T/g
生理食塩水(++)	Q361± Q191	1000
生理食塩水(++)	Q361± Q132	1000
防腐コートソル	Q340± Q162	943
DS 4152 (Q61mg/massive 50)	Q361± Q070	1000
DS 4152 (Q1mg/massive 50)	Q261± Q077	723
DS 4152 (Q61mg/massive 50) +防腐コートソル	Q0693± Q018	125°
DS 4152 (Q1mg/massive 50) +防腐コートソル	Q028± Q011	24°
DS 4152 (Q61mg/massive 50)	Q322± Q071	824
DS 4152 (Q1mg/massive 50)	Q358± Q115	948
DS 4152 (Q61mg/massive 50) +防腐コートソル	Q063± Q036	161°
DS 4152 (Q1mg/massive 50) +防腐コートソル	Q036± Q018	49°

*P<0.05, **P<0.01 ステューデントt-
検定による

試験し使用用とする。

実用例12

実用:

DS 4152 60g、アレドジョン20g、
乳酸50g、トクモコシデンアン136g、
カルボキシタルセルロースカルシクム5g、
ヒドロキシアセピルセルロース3g及びステ
アリン酸マグネシクム0.5gを方法に従つて
混合、打撃し、1袋とする。

4 図4の結果を説明

図1図ないし図4は高濃ゲル戻過クロマ
トグラムである。

以上

図11

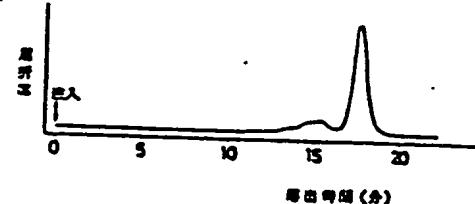
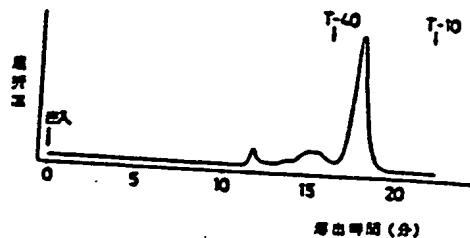
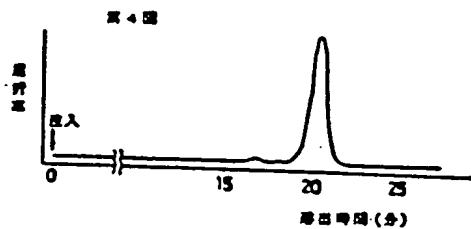
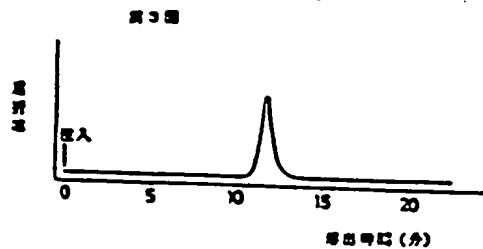


図22





第1頁の続き

④Int.Cl.*

A 61 K 31/723
37/02
C 08 B 37/00
C 12 P 19/04
/(A 61 K 31/723
31/56)

識別記号

ADU
ABE

検査室整理番号

8615-4C
6779-4C
C-8515-4B
7252-4C

⑤発明者 小河 秀正 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内